

# **Az aszkorbinsav koncentráció és redox státusz szabályozása növényi sejtekben bioszintézis és intracelluláris transzport révén**

Témavezető neve: Szarka András

A kutatás időtartama: 4 év

## **Tudományos háttér**

A C-vitamin, vagy más néven aszkorbinsav kiemelkedő szereppel bír a sejtek antioxidáns kapacitásának biztosításában, e mellett számos enzim kofaktora. Az emberi szervezet mégsem képes előállítására, megszerzésére külsőleg, elsősorban növényi forrásokra szorulunk. Ezeket a tényeket figyelembe véve különösen érdekes, hogy az aszkorbát szintézisére képes állatokban folyó reakciók mintegy négy évtizede ismeretesek, addig a növényekben folyó aszkorbát bioszintézis útvonala a közelmúltig ismeretlen volt.

A Wheeler és Smirnoff által elsőként javasolt és azóta számos független laboratórium által megerősített növényi aszkorbát bioszintetikus útvonal kiinduló vegyülete a glukóz, mely többek között L-galaktono-1,4-lakton köztiterméken keresztül aszkorbáttá alakul. A bioszintetikus útvonal az utolsó lépés kivételével a citoszólban játszódik le. A bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim (L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz) a mitokondrium belső membránjában található, szoros kapcsolatban a mitokondriális elektrontranszferrel.

Az aszkorbinsav, jó hatásfokkal eliminálja a legtöbb szén-, oxigén-, nitrogén- és kéncentrumú gyököt, ez a tulajdonsága különösen fontos táplálékkiegészítővé teszi az egészséges szervezet számára is, azonban megnövekedett oxidatív stresszel járó kórképekben (pl.: gyulladásos folyamatok, cukorbetegség, rheumatoid arthritis) a megfelelő mennyiségű napi bevitelére még inkább ügyelni kell. Az E vitaminnal együtt fontos tényező a szív és érrendszeri megbetegedések megelőzésében. A szervezetben zajló lipidperoxidációhoz hasonlóan fontos szerepet játszik az élelmiszerekben zajló lipidperoxidációs folyamatok, az avasodás elleni védelemben.

A galaktonolakton dehidrogenáz enzim topológiája ismeretlen. A különböző variációjú topológiák, különböző transzporterek lehetőségét vetették fel a növényi mitokondrium belső membránjában. Hiszen ha az enzim aktív centruma a mátrix felé néz a szubsztrátnak a galaktonolaktonnak valahogyan a mátrixba kell jutnia és a terméknek, az aszkorbinsavnak ki

kell jutnia onnan (az aszkorbinsav jelenlétét majdnem minden sejtorganelumban leírták). Ha a két membrán közti tér felé néz akkor pedig az aszkorbinsavnak kell a mátrixba jutnia, ahol jelenlétét leírták, amit a mitokondrium működése során képződött reaktív oxigéntartalmú anyagok elleni védelem is messzemenően indokolttá tesz. Tehát mindenképpen léteznie kell egy, a hidrofil sajátságú aszkorbinsav membránon keresztüli szállításáért felelős transzporternek.

Kutatásaink indulásakor a következő célokat tűztük ki: **(i)** a mitokondriális aszkorbát és dehidroaszkorbát transzport jellemzése **(ii)** a mitokondriális aszkorbinsav transzporttal összefüggő metabolikus folyamatok vizsgálata **(iii)** az intracelluláris aszkorbáttranszport hatásának vizsgálata a steady-state intracelluláris aszkorbinsav koncentrációra.

## **Eredmények**

### **1. A mitokondriális aszkorbát és dehidroaszkorbát transzport leírása és jellemzése**

A kísérletes munka kezdeteként a kísérlet alapjául szolgáló sejtvonalt (BY2 dohány) tenyésztési körülményeit megteremtettük, a sejtekből történő transzportméréseknek megfelelő mitokondrium izolálási módszer kidolgoztuk. A mitokondriális frakció minőségét markerenzim aktivitások révén ellenőriztük (citokróm c oxidáz). Ezt követően kísérleteink során BY2 dohány sejtekből izolált mitokondriumok esetében leírtuk a dehidroaszkorbinsav és a glukóz mitokondriális felvételét. Radioaktívan jelölt ligandok rapid filtrációja során specifikus glukóz és dehidroaszkorbát transzportot figyeltünk meg, amelyek hőmérséklet, időfüggést és szubsztráttelítést mutattak. Ugyanakkor a redukált aszkorbinsav mitokondrium membránon keresztüli transzportját egész kis mértékűnek találtuk. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a két membrán közötti térben szintetizálódó aszkorbinsav oxidált formájában képes a mitokondriális membrán átlépésére. A glukóztranszport vizsgálataink során kétirányúnak bizonyult.

A mitokondriális légzés KCN-dal történő gátlása és a szétkapcsolószer 2,4-dinitrofenol nem befolyásolta a vizsgált transzportfolyamatokat. A dehidroaszkorbát transzport glukózzal és genisteinnel gátlható volt, a glukóz transzportra a 3-O-metil glukóz, a D-mannóz, a cytochalasin B és a genistein hatott gátlólag. Az eredmények igazolják a mitokondriális dehidroaszkorbát és glukóz transzport meglétét, valamint azt valószínűsítik, hogy azonos,

mindenesetre közeli rokonságban álló transzporterek (vagy transzportrendszerek) mediálják a két transzportfolyamatot.

## **2. A mitokondriális aszkorbinsav transzporttal összefüggő metabolikus folyamatok vizsgálata, valamint az intracelluláris aszkorbáttranszport hatásának vizsgálata a steady-state intracelluláris aszkorbinsav koncentrációra.**

Kísérleteink során a korábbi pontban leírt mitokondriális dehidroaszkorbát transzport következményeit vizsgáltuk. Állati sejteken nyert információ alapján feltételeztük, hogy a mitokondriumba jutott dehidroaszkorbát redukálódik a mátrixban. Feltételezésünk igazolására megvizsgáltuk a dehidroaszkorbát redukcióját növényi mitokondriumokban. A mitokondriumokat BY2 dohány sejtekből preparáltuk differenciál és azt követő gradiens centrifugálással. A frissen izolált mitokondriumokat 1 mM dehidroaszkorbát jelenlétében inkubáltuk, majd a redukálódás során keletkezett aszkorbát mennyiségét HPLC-vel követtük nyomon. A mitokondrium dehidroaszkorbát redukációs képessége egyértelműnek bizonyult, továbbá jelentős aszkorbát szintet tudott fenntartani. Az inkubációs közeghez adott légzési szubsztrát szukcinát egyértelműen fokozta az aszkorbinsav keletkezését. A komplex I szubsztrát malát, valamint a komplex I inhibitor rotenon nem befolyásolta a dehidroaszkorbátból történő aszkorbát képződést. Az előző esethez hasonlóan a komplex III inhibitor antimycin A, az alternatív oxidáz inhibitor szalicilhidroxamin sav és a szétkapcsolószer 2,4-dinitrofenol sem gyakorolt hatást a mitokondriális aszkorbát keletkezésre. A gátlószerek hatását a légzési szubsztrát szukcinát nem befolyásolta. Az előző gátlószerekkel ellentétben a szukcinát dehidrogenáz kompetitív gátlószere a malonát gyakorlatilag teljesen felfüggesztette a szukcinát függő aszkorbinsav keletkezést a mitokondriumban. A komplex IV inhibitor KCN jelentős mértékben fokozta az aszkorbinsav felhalmozódását a mitokondriumban. Dehidroaszkorbát hozzáadása nélkül a különböző inhibitorok nem befolyásolták az alap mitokondriális aszkorbát szintet. Megállapítottuk, hogy a dehidroaszkorbát, alameticinnel permeabilizált mitokondriumokban nem befolyásolta a külsőlegesen hozzáadott NADH szintjét. Amely további bizonyítékkal szolgált, hogy sem a komplex I, sem az NDin(NADH), sem az NDex(NADH) nem vesz részt a redukációs folyamatban.

ESR méréseink során 1 mM dehidroaszkorbátot tartalmazó mitokondriális szuszpenzióban aszkorbil gyök jelet tudtunk detektálni. A gyökszintet a szukcinát nem befolyásolta, valamint 60 perces inkubációs időn keresztül végig megtartottnak bizonyult. Az aszkorbil gyök teljesen

eltűnt 1 mM KCN hatására. Az aszkorbát oxidációját, mint az aszkorbát koncentráció csökkenését megvizsgálva megállapítottuk, hogy KCN távollétében a mitokondrium rendkívül gyorsan eloxidálta a hozzáadott aszkorbátot, ugyanakkor KCN jelenlétében az aszkorbát szint megtartottnak bizonyult. Ezek arra utalnak, hogy a dehidroaszkorbát hozzáadását követően mérhető aszkorbil gyök szint nem a dehidroaszkorbát redukciója során jön létre, hanem a redukció eredményeképp termelődött aszkorbát mitokondriális oxidációjának következménye.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a növényi mitokondrium légzési elektron transzfer lánc - közelebbről a II-es légzési komplex - fontos szerepet játszik a dehidroaszkorbát mitokondriális redukciójában.

### **3. A mitokondriális glukóz transzporttal összefüggő metabolikus folyamatok vizsgálata**

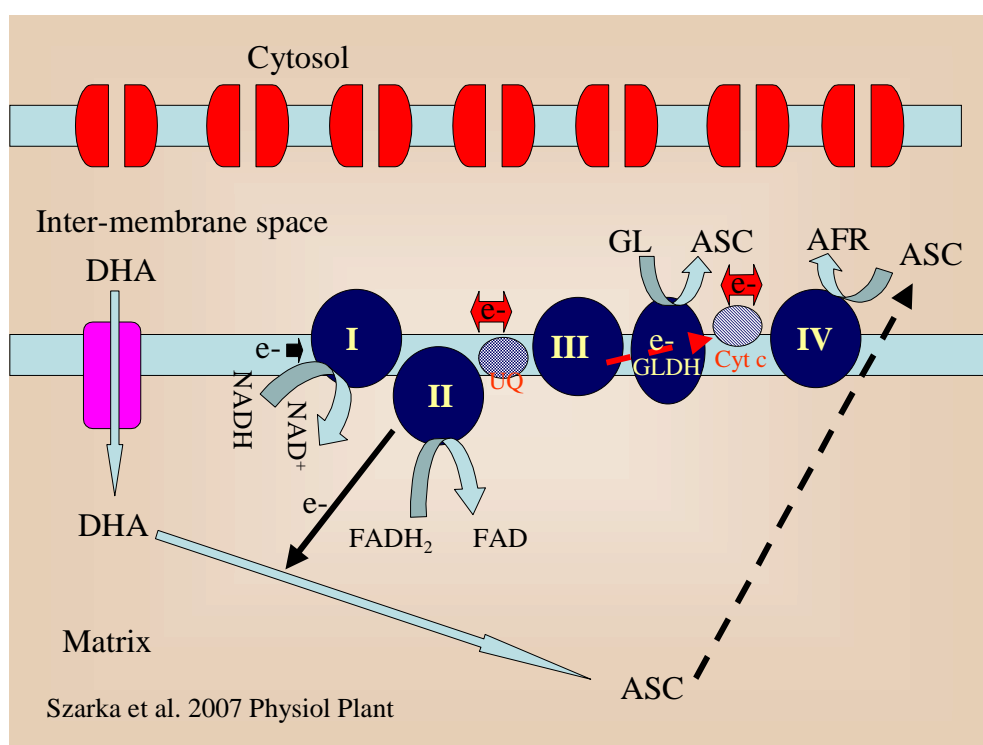
Kísérleteink során az 1. pontban leírt mitokondriális glukóz transzport következményeit vizsgáltuk. Genetikai bizonyítékok alapján feltételeztük, hogy az alkalikus/neutrális invertázok egy csoportja megtalálható a növényi sejtorganellumokban. Kísérleteink során inveráz aktivitást találtunk frissen izolált csicsóka mitokondrium mátrix alfrakciójában. Az enzimaktivitás pH optimuma, kinetikai paraméterei, valamint inhibitor profilja alapján az újonnan leírásra került enzim a neutrális invertázok családjába sorolható. Az enzim topológiája miatt vizsgálatainkat kiterjesztettük szubsztrátjának, valamint termékeinek mitokondriális belső membránon keresztüli transzportjára. Bidirekcionális, telíthető, valamint mitokondriális membránpotenciáltól független szacharóz, glukóz és fruktóz transzportot találtunk a mitokondriális belső membránban. A szacharóz transzportot nem tudtuk befolyásolni az ismert proton-szacharóz transzporter gátlókkal. A különböző kinetikai paraméterek, valamint a kereszt-gátlás hiánya arra utalnak, hogy a transzportfolyamatokat három egymástól független transzporter mediálja. A mitokondriális invertázrendszer – amely a mátrixban található invertáz aktivitásból, valamint a hozzátartozó cukortranszporterekből áll – szerepet játszhat ozmoregulációs folyamatokban, valamint az intermedier anyagcserében.

## A kísérleti eredményekre épülő modellek

Kísérleti eredményeink alapján a következő modelleket állítottuk fel:

### 1. mitokondriális aszkorbát/dehidroaszkorbát transzport és redukció

A dehidroaszkorbát transzporterén keresztül bejut a mitokondriumba, ahol a II. komplexről származó elektronok redukálják a komplex mátrix felé eső oldalán. Az akkumulálódott redukált aszkorbinsav egy része jelenleg nem definiált módon kijut a mitokondriumból, ahol oxidálódik elektronokat juttatva a IV. Komplexnek (1. ábra).



1. ábra

## 2. mitokondriális invertáz aktivitás és szacharóz, glukóz, fruktóz transzport

A szacharóz transzporterén keresztül bejut a mitokondriumba. A mitokondriális mátrixban található invertáz hasítja glukózára és fruktózára, amely cukrok transzportereiken keresztül kijutnak a mitokondriumból (2. ábra).

